

Apparatus for the simultaneous synthesis of a plurality of polypeptides

Patent Number: DE3723004
Publication date: 1989-01-26
Inventor(s): KNAPP WILHELM (DE); SCHNORRENBURG GERD DIPL CHEM D (DE)
Applicant(s): BOEHRINGER INGELHEIM KG (DE)
Requested Patent: ☐ DE3723004
Application Number: DE19873723004 19870711
Priority Number(s): DE19873723004 19870711
IPC Classification: C07K1/04
EC Classification: B01J19/00C, C07K1/04B
Equivalents: ☐ DE8717464U

Abstract

Apparatus for the solid-phase synthesis of a plurality of polypeptides, which has a plurality of containers (2) arranged on a mounting device (1), a reaction vessel (3) and individual reaction vessels (5) arranged in

vessel (4).



Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3723004 A1

⑤① Int. Cl. 4:
C07K 1/04

②① Aktenzeichen: P 37 23 004.2
②② Anmeldetag: 11. 7. 87
④③ Offenlegungstag: 26. 1. 89

DE 3723004 A1

⑦① Anmelder:

Boehringer Ingelheim KG, 6507 Ingelheim, DE

⑦② Erfinder:

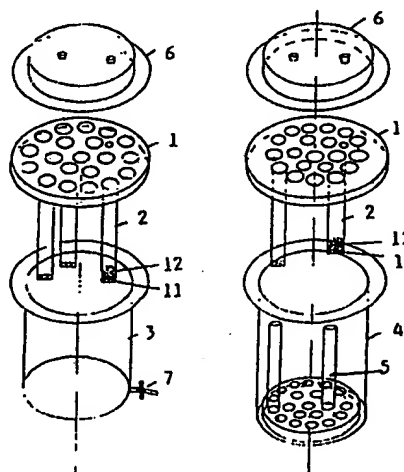
Schnorrenberg, Gerd, Dipl.-Chem. Dr., 6535
Gau-Algesheim, DE; Knapp, Wilhelm, 6537
Gensingen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Vorrichtung für die simultane Synthese mehrerer Polypeptide

Vorrichtung für die Festphasensynthese mehrerer Polypeptide, die mehrere Behälter (2) angeordnet an eine Haltevorrichtung (1), ein Reaktionsgefäß (3) und in Gefäß (4) angeordnete individuelle Reaktionsgefäße (5) aufweist.

Fig. 1



DE 3723004 A1

Patentansprüche

1. Vorrichtung für die Festphasensynthese mehrerer Polypeptide, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Behälter (2), die für die Aufnahme des polymeren Trägers bestimmt sind und deren Wände zumindest teilweise aus porösem Material bestehen, an einer Haltevorrichtung (1) angeordnet sind, mittels der die Behälter (2), für die gemeinsamen Syntheseschritte in ein Reaktionsgefäß (3) und für die individuellen Syntheseschritte in die in Gefäß (4) angeordneten individuellen Reaktionsgefäße (5) gleichzeitig eingebracht werden können.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Behälter (2) die Form eines Zylinders haben, dessen Grundfläche von einer Membran oder einer Glasfritte gebildet wird und der oben offen ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Behälter (2) in der Haltevorrichtung (1) hängend angeordnet sind.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Glas hergestellt ist.

Beschreibung

Bei der Festphasenpeptidsynthese, basierend auf der von R. B. Merrifield entwickelten Methode (G. Barany, R. B. Merrifield in *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, 3-284 (1980), Hrsg. Gross, Maierhofer Academic Press, New York) wird die Peptidkette schrittweise aufgebaut. Die Syntheseschritte können wie folgt zusammengefaßt werden:

- a) Binden der ersten Aminosäure der Peptidkette über eine Ankergruppe an einen polymeren Träger,
- b) schrittweises Ankondensieren der übrigen Aminosäuren der Peptidkette,
- c) Zwischenschritte zwischen den einzelnen Kondensationen bestehend aus Waschen, Abspalten von Schutzgruppen und Neutralisieren,
- d) gewünschtenfalls acylieren endständiger Aminogruppen,
- e) Abtrennen des Peptids vom Träger.

Bei dieser Peptidsynthese muß mit einer Syntheszeit von bis zu 18 Stunden, meist bis zu 4 Stunden pro Aminosäure gerechnet werden. (Die einzelnen Kondensationen benötigen meist 1 bis 2 Stunden Reaktionszeit; zwischen den Kondensationen sind in der Regel etwa 10 Zwischenschritte erforderlich, für die je ca. 2 bis 15 Minuten gerechnet werden müssen.) Die Herstellung von Peptiden bestehend aus einer größeren Anzahl von Aminosäuren ist somit sehr langwierig, arbeitsintensiver und teuer.

Für die Festphasensynthese analoger Peptide ist von R. A. Houghten (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, pp. 5131-5135, August 1985, *Immunology*) eine Methode beschrieben worden. Danach wird der polymere Träger für die Synthese in Portionen von je 50-100 mg in kleine poröse Polypropylenbeutel gefüllt, die Beutel werden zugeschmolzen, die in den Synthesen einheitlichen Zwischenschritte (Waschen, Neutralisieren, Abspalten von Schutzgruppen) werden an allen Beuteln gleichzeitig in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß ausgeführt, die einzelnen Kondensationen werden getrennt

ausgeführt. Die Methode kann manuell oder automatisiert unter Verwendung eines Peptidsynthesizers ausgeführt werden.

Der Nachteil der beschriebenen Methode liegt darin, daß nur kleine Peptidmengen in den einzelnen Beuteln hergestellt werden können, daß die Handhabung der Beutel etwas umständlich ist, daß die Beutel nicht wieder verwendet werden können, daß für die Kondensationen der verschiedenen Peptide die Beutel voneinander getrennt werden müssen und keine Kontrollproben während der ganzen Synthese entnommen werden können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung bereitzustellen, die die vollständige simultane Synthese mehrerer Polypeptide ermöglicht und die oben genannten Nachteile vermeidet.

Diese Aufgabe wird durch die im kennzeichnenden Teil von Anspruch 1 angegebenen Merkmale gelöst.

Die Vorrichtung wird für die simultane Synthese von verschiedenen Polypeptiden verwendet. Besonders geeignet ist sie für die Synthese von Polypeptiden mit möglichst ähnlichen Synthesestrategien, z.B. für die Synthese von Polypeptiden bestehend aus 15 bis 20 Aminosäuren, Polypeptiden mit ähnlichen Kettenlängen, Polypeptiden bei deren Synthese möglichst identische Schutzgruppenkombinationen verwendet werden.

Für die Durchführung der Synthesen wird je eine Portion des polymeren Trägers (12) bzw. des Trägers mit einem Teil der Peptidkette in die Behälter (2) gefüllt. Für die Syntheseschritte, die den herzustellenden Polypeptiden gemeinsam sind (ein Teil der Kondensationen, Zwischenschritte wie Waschen, Abspalten von Schutzgruppen, Neutralisieren), werden die Behälter (2) mit Hilfe der Haltevorrichtung (1) in das Reaktionsgefäß (3) eingebracht. Die Wasch- oder Reaktionslösung wird im Reaktionsgefäß (3) vorgelegt oder nachträglich eingefüllt. Die Flüssigkeit dringt durch den porösen Teil der Wände der Behälter (2), die Umsetzungen erfolgen an den an dem Träger (12) gebundenen Peptiden in den Behältern (2). Für die individuellen Syntheseschritte wird das für das betreffende Polypeptid erforderliche Reagens in dem entsprechenden individuellen Reaktionsgefäß (5) vorgelegt. Die Behälter (2) werden dann in die entsprechenden individuellen Reaktionsgefäße (5), die im Gefäß (4) angeordnet sind, eingebracht, das Reagens dringt durch den porösen Teil der Wände in die entsprechenden Behälter (2) und die individuellen Syntheseschritte werden somit simultan ausgeführt. (Es ist auch möglich, die individuellen Reagentien nach dem Einbringen der Behälter (2) in die individuellen Reaktionsgefäße (5) zu füllen). Falls manche der gewünschten Kondensationen unterschiedliche Schutzgruppen erfordern, wird das Abspalten der unterschiedlichen Schutzgruppen ebenfalls in den individuellen Reaktionsgefäßen (5) durchgeführt.

Die Durchführung der Synthesen mit der erfindungsgemäßen einfachen Vorrichtung ist also mit relativ wenig Arbeitsaufwand möglich. Durch die Möglichkeit, alle Synthesen simultan auszuführen, was mit herkömmlichen einfachen Vorrichtungen nicht möglich ist, wird die Herstellungszeit und der Arbeitsaufwand für eine große Anzahl von Polypeptiden wesentlich reduziert.

Vorteilhafte Merkmale der erfindungsgemäßen Vorrichtung:

Die Vorrichtung besteht aus Glas oder lösungsmittelresistentem Kunststoff, z.B. Polypropylen, Teflon.

Im Hinblick auf die manuelle Verwendung der Vorrichtung, sind die Gefäße 3 und 4 in der Größe be-

schränkt, z.B. Zylinder von etwa 100 bis 300 (vorzugsweise etwa 200) mm Durchmesser und Höhe. Vorzugsweise enthält die Vorrichtung etwa 20 Behälter (2).

Die Anzahl der Behälter (2) ist gleich der Anzahl der individuellen Reaktionsgefäße (5). Die Anordnung der Behälter (2) an der Haltevorrichtung (1) entspricht der Anordnung der individuellen Reaktionsgefäße (5) in Gefäß (4), so daß die Behälter (2) leicht in die individuellen Reaktionsgefäße (5) eingebracht werden können. Es ist zweckmäßig, die individuellen Reaktionsgefäße (5) als oben offene und unten abgeschlossene röhrenförmige Gefäße zu gestalten, die ausreichend groß sind, um je einen Behälter (2) aufzunehmen. Vorzugsweise umschließt das individuelle Reaktionsgefäß (5) den Behälter (2) eng, so daß nur geringes Totvolumen entsteht und eine dementsprechende geringere Menge der Reagenzflüssigkeit benötigt wird, um den polymeren Träger zu bedecken.

Die Behälter (2) sind zweckmäßig so bemessen, daß sie 0,1 bis 3 g (vorzugsweise 1 bis 2 g) polymeres Trägermaterial aufnehmen können. Sie sind aus lösungsmittelresistentem formfestem oder flexiblem Material, z.B. aus Glas, Polypropylen oder Teflon. Die Porengröße der porösen Teile der Wände ist so gewählt, daß die Flüssigkeiten rasch in die Behälter (2) eintreten und daraus ausfließen können und gleichzeitig der polymere Träger, ein feinkörniges Material, in den Behältern (2) zurückgehalten wird. Gewebe, Siebplatten und Fritten aus den oben genannten Materialien sind zweckmäßig. Bei Behältern (2) aus Glas werden vorzugsweise Glasfritten verwendet, vorzugsweise D2-Fritten, deren Porengröße 40–100 µm ist. Die Behälter (2) sind vorzugsweise zylindrisch oder birnenförmig oder sind Rundkolben. Die Behälter (2) sind vorzugsweise oben offen oder leicht zu öffnen.

Die Haltevorrichtung (1) ist vorzugsweise so gebaut, daß die Behälter (2) an oder in ihr so eingehängt werden können, daß der größere Teil der Behälter (2) unter der Haltevorrichtung hängt.

Um die Vorgänge (Kondensation, Waschen etc.) in den Behältern (2) zu beschleunigen, ist es vorteilhaft, den polymeren Träger in der Flüssigkeit zu suspendieren oder zumindest zu bewegen. Das kann durch z.B. Schütteln der Vorrichtung oder Ultraschall erreicht werden. Zum Beispiel wird die Vorrichtung an einer üblichen Schüttelapparatur befestigt.

Die nachfolgende Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung dient in Zusammenhang mit den Zeichnungen der näheren Erläuterung. Diese Ausführungsformen sind aus Glas, woraus sich einige Konstruktionsmerkmale ergeben.

Es zeigen

Fig. 1 schematische Darstellung der Vorrichtung (Explosionszeichnung)

Fig. 2 Schnittansicht eines Teils der Vorrichtung

Fig. 3 Schnittansicht einer nur teilweise dargestellten Vorrichtung, die von der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform abweicht.

Fig. 4 schematische Darstellung eines Teils der Vorrichtung

Die in Fig. 1 dargestellte Vorrichtung weist eine Haltevorrichtung 1, an der mehrere zylindrische Behälter 2 befestigt sind, ein Reaktionsgefäß 3, ein Gefäß 4, das mehrere individuelle Reaktionsgefäße 5 aufweist, und einen Deckel 6 auf. Für die für alle Synthesen gemeinsamen Schritte wird die Haltevorrichtung 1 mit den Behältern 2 in das Reaktionsgefäß 3 eingebracht. Für die individuellen Schritte der Synthesen wird die Haltevorrich-

tung 1 mit den Behältern 2 in das Gefäß 4 eingebracht, wobei die Behälter 2 jeweils in die entsprechenden individuellen Reaktionsgefäße 5 eingetaucht werden.

Die Gefäße 3 und 4 sind zylindrische Glasgefäße mit Planschliff, auf die der Deckel 6, ebenfalls mit Planschliff, paßt. Reaktionsgefäß 3 hat einen verschließbaren Ablauf 7. Der innere Durchmesser der Gefäße ist gleich.

Die Haltevorrichtung 1 ist eine Glasplatte, deren Durchmesser dem Durchmesser des Planschliffs der Gefäße 3 und 4 entspricht. Sie liegt bei der Verwendung auf dem Planschliff des Gefäßes 3 bzw. 4 auf. Sie weist 20 gleichmäßig über die Fläche verteilte Schlifföffnungen auf, in die die Behälter 2 mit Kern einrasten, so daß die Behälter 2 in der Glasplatte hängen. Die Schlifföffnungen sind um eine mittlere Öffnung auf 2 konzentrischen Kreisen angeordnet.

Die Glasplatte kann Griffe zur bequemen Handhabung aufweisen sowie mindestens eine (in der Zeichnung angedeutete) Einfüllöffnung.

Die Schlifföffnungen, Behälter 2 und individuellen Reaktionsgefäße 5 sind markiert, z.B. durch fortlaufende Zahlen.

Die Behälter 2 sind zylindrische Glasgefäße, die oben offen sind und unten durch eine Glasfritte 11 (vorzugsweise D2) abgeschlossen sind. In diese Behälter wird der polymere Träger 12 für die Peptidsynthese eingebracht.

Das Gefäß 4 enthält die individuellen zylindrischen Reaktionsgefäße 5, deren Zahl gleich ist der Anzahl der Behälter 2 und deren Anordnung der Anordnung der Schlifföffnungen bzw. Behälter 2 in der Haltevorrichtung 1 entspricht. Die individuellen Reaktionsgefäße 5 sind durch unten angesetzte Schliffkerne in Bohrungen der Bodenplatte 15 des Gefäßes 4 gehalten. Die individuellen Reaktionsgefäße 5 sind oben offen. Ihre Maße sind so gewählt, daß sie die jeweiligen Behälter 2 eng umschließen.

Der Deckel 6 weist eine Einfüllöffnung und eine Öffnung für den Druckausgleich auf. Eine Einfüllvorrichtung kann durch den Deckel und die Öffnung in der Lochplatte bis in das Reaktionsgefäß 3 reichen.

Fig. 2 zeigt eine Schnittansicht eines Teils der Vorrichtung: Haltevorrichtung 1, darin hängenden Behälter 2 (mit Glasfritte 11 und Schliffkern 13) in einem individuellen Reaktionsgefäß 5 (mit Schliffkern 14 in der Bodenplatte 15 von Gefäß 4 gehalten). Die Gefäße sind in der Position gezeigt, in der sie für die individuellen Syntheseschritte verwendet werden.

Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform der Vorrichtung, in der die Haltevorrichtung 1 auf einer Auflage 8 in Reaktionsgefäß 3 aufliegt und über der Haltevorrichtung 1 eine Verteilerplatte 10 auf einer Auflage 9 liegt. Die Verteilerplatte 10 ist eine Glasplatte, die Löcher aufweist, die konzentrisch mit den Löchern der Haltevorrichtung 1 angeordnet sind. Die Durchmesser der Löcher der Verteilerplatte 10 sind etwas kleiner als die Öffnungen der Behälter 2. Die Verteilerplatte 10 liegt oberhalb der oberen Ränder der Behälter 2. Bei dieser Ausführungsform kann Waschflüssigkeit sowie Reagenzlösung auf die Verteilerplatte aufgebracht werden, die dann in die einzelnen Behälter 2 fließt.

Fig. 4 zeigt die schematische Darstellung einer Variante der Behälter 2 (Rundkolben mit Fritte 11) in einem individuellen Reaktionsgefäß 5, das auch hier den Behälter eng umschließt, um das Totvolumen zwischen Behälter 2 und Reaktionsgefäß 5 möglichst klein zu halten. Gezeigt sind ferner die Schliffkerne 13 und 14. Um das Totvolumen auch im Reaktionsgefäß 3 möglichst klein zu halten, kann in das Reaktionsgefäß eine Lochplatte

gelegt werden, in deren Löcher die Behälter 2 passen.

Ferner können an den Gefäßen 3 und 4 und Deckel 6 Anschlüsse für Schutzgase, Vakuum oder Druck eingebaut sein.

Der Deckel (6), die Haltevorrichtung (1) und Gefäß 3 bzw. 4 können durch Klammern zusammengehalten werden.

Wird die Vorrichtung aus Kunststoff hergestellt, so müssen oder können einige Konstruktionsmerkmale dem Material angepaßt werden, z.B.: wenn das Material wesentlich leichter ist als Glas, kann die Vorrichtung auch größer gebaut werden; Glasschliffe werden durch Schraubverbindungen ersetzt oder zum Teil durch Verkleben, vorausgesetzt die Klebstoffe sind resistent gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln; die Glasfritten werden durch Kunststoffgewebe ersetzt.

Für die im Reaktionsgefäß 3 ausgeführten Syntheseschritte kann die Vorrichtung (Gefäß (3) mit Deckel und entsprechenden Zu- und Abflußvorrichtungen) auch mit Peptidsynthesisern gekoppelt werden, was eine halbautomatische Syntheseführung ermöglicht.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

3723004

1107-07

Nummer:
Int. Cl.4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

Fig.: M: 1 M
37 23 004
C 07 K 1/04
11. Juli 1987
26. Januar 1989

Fig. 1

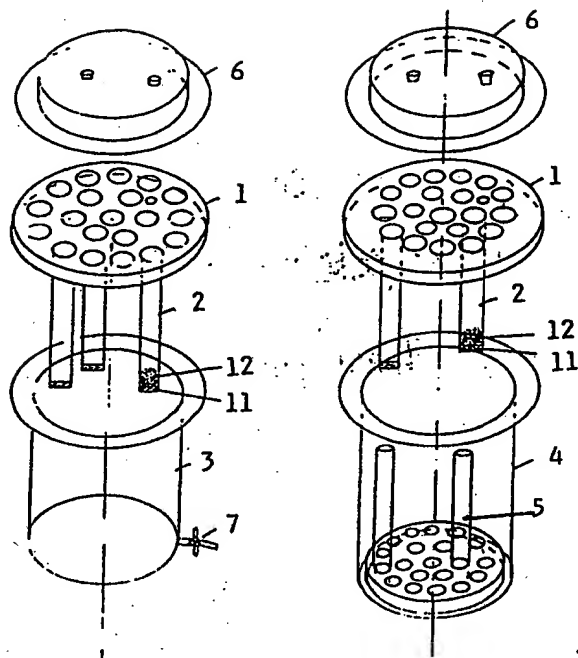


Fig. 2

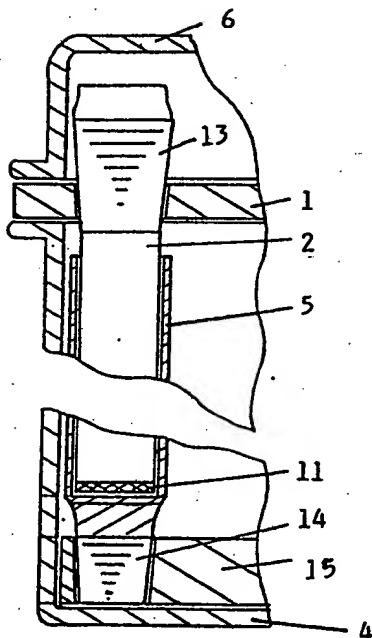


Fig. 3

3723004

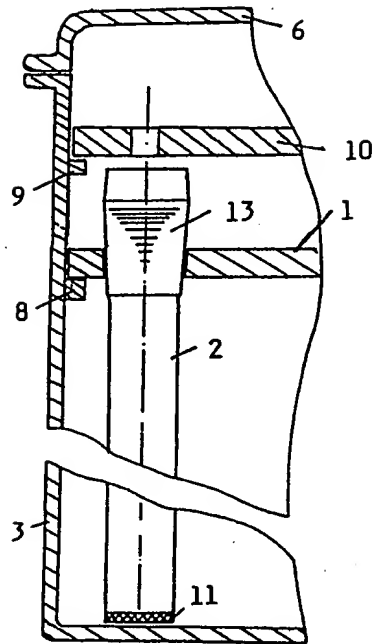
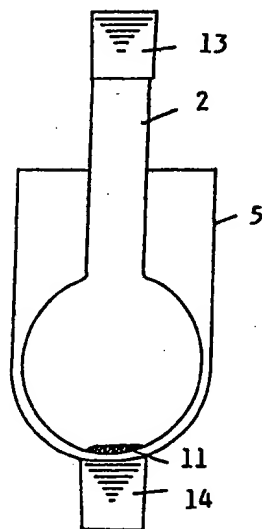


Fig. 4



ORIGINAL INSPECTED